19日本国特許庁(JP)

① 特許出願公開

平2-291276 ⑫ 公 開 特 許 公 報 (A)

@Int. Cl. 3

識別配号

庁内整理番号

40公朝 平成2年(1990)12月3日

C 12 N 15/60 13/06 C 12 P

ZNA

6807-4B 8931-4B *

審査請求 未請求 請求項の数 13 (全18頁)

❷発明の名称

C. グルタミクム株から単離されたDNAフラグメント、複製ペヒ クル、宿主パクテリア、コリネパクテリウム、ブレビパクテリウム 及びレーアミノ酸の製法

创持 題 平1-234830

C

20出 **20** 平 1 (1989) 9 月 12 日

優先権主張

の1988年9月12日匈イギリス(GB)の8821319.4

@発明者

ベルント・パツハマン

ドイツ連邦共和国ヴェルテール・マイヤーフェルト 10

の出願人

デグツサ・アクチエン

ドイツ連邦共和国フランクフルト・アム・マイン・ワイス

フラウエンストラーセ 9

ゲゼルシヤフト 弁理士 矢野 敏雄 の代 理 人

最終頁に続く

1 発明の名称

C. グルタミクム株から単粒された DNA フラグ メント、複数ペヒクル、宿主パクテリア、コ りネパクテリウム、プレビパクテリウム及び L-ナミノ酸の製法

2 特許請求の範囲

- 1 ホスホエノールピルピン飲カルポキシラー ゼ (PEPC) の活性を有する蛋白質の製造をコ ードナる情報である遺伝子配列を有する、C. グルタミクム株から分離された DNA マラグメ ント・
- 2. 宋潜にかいて 8al I 別限酵業サイトに接続 した本質的に5422個の塩基対から成るフ ラグメントである、特許請求の範囲終1項記 戦の DNA フラクメント。
- 5. PEPC の構造遺伝子をコードする 2 7 5 7 個の塩器対から成る、特許請求の範囲第1項 又は第2項配収の DNA フラグメント。
- 4. PRPCの製造をコードし、そのN 宋海丁ミ

ノ彼の配列がThri- Asp - Phe - Leu - Args - Asp - Asp - ILe - Arg - Phe10- Leu -Gly - Gla - ILe - Leuls である、特許請求 の範囲第1項から第5項までのいずれかに配 配の DNA フラグメント。

- 5. コリオパクテリウム・グルタミクム ATCC 15052から分離された特許請求の範囲無 1項から第4項までのいずれかに配収の DNA フラグメント。
- 6. 特許請求の範囲第1項から第5項までのい ナれかの DNA フラグメントを含有する、コリ ネパクテリウム又はナレビパクテリウムにお いて複製できるペピクル。
- 7. プラスミド pDM 2 又は pDM 6 である、特許 防水の範囲第る項の表現ペピクル。
- 8. 関係アミノ酸を適宜生酸する、等許請求の 範囲館も項又は第7項配数のペピクルを含有 し、コリネパクテリウム異又はプレビパクテ りクム属に属する宿主パクテリア。
- 9. D8M 4 6 9 7 と同一の特性を有するものの

群より遊ばれたコリネパクテリウム。

- 10. DSM 5 3 9 9 と同一の特性を有するものの 群より退ばれたプレビバクテリウム。
- 11. 特許請求の範囲報名項、部9項又は紹10項のパクテリウムを適当な課質中で培養し、この媒質からレーアミノ酸を回収することから成る範疇による、レーリシン、レーメテオニン、レースレート、レーグルタミン、レープルのリン、レーナンの選ばれるレーアミノ酸の製造方法。
- 12. 特許請求の範囲第8項又は銀9項に記載の パクテリウムを培養し、し・リジンを回収す ることから成る、特許請求の範囲第11項の 発展によるし・リジンの製造方法。
- 15. 特許請求の範囲第8項又は第10項に記載のペクテリウムを培養し、レーイソロイシン及びレースレオニンを回収することから成る、特許請求の範囲第11項の発酵によるレーイ

びレーイソロイシン等のアミノ酸は、一連の枝分かれしたかつ高度に相互に制御された生合成経路にかいてレーアスパルテートから誘導されてかり、一方、レーグルタメート、レーグルタミン、レープロリン、レーナルリン、レーオルニチン等のアミノ酸は TCAサイクルの中間体から砂導される。

とのよりに、 PEPC は上述の十ペてのアミノ 彼の生合成に関与している。

上述の考察から、L・リジン等のアミノ限の 生合成レベルは、細胞質内の PBPC 等の酵素の 特異的活性に依存して変化することは明らかで ある。

アミノ酸の生合成における PEPC の果た十重要な役割を考慮すると、 PEPC の活性を増大することによりアミノ酸災盗のための改善された方法を提供しようと努めることは常に宜ましい。

例えば、ヨーロッパ特許出版第0145195 号明樹なは、プレピパクテリウム・ラクトファ ーメンタム (Brevibacterium lactofermentum) ソロイシン及びL-スレオニンの製造方法。

- 5 発明の詳細な説明
 - 〔産薬上の利用分野〕

本発明は PBPC をコードするで、グルタミクム 休から分離された DNA フラグメント 及び前記フラグメントを運搬する複製 DNA、 この復製 DNA を運搬する関係及びこの関係を用いるしってミノ級の製法に関する。

〔從米技術〕

ホスホエノールピルピン取力ルポキシラーゼ(BC4.1.1.5.1;以下PEPCと配す)は、アミノ献代謝に特に関係する辞案であり、いわゆるアナナレロテイツク機能(細胞に常時オキザロ酢酸を供給することを保証する)に関連している。

オキザロ酢酸は、L・ナスパルテートの直接の前以体として、かつ、トリカルポン酸サイクル(TCAサイクル)の一員として、アミノ酸代樹にかいて中心的地位を占めている。事実、L・リジン、L・メチオニン、L・スレオニン及

ATCC 1 5 8 6 9 から分離された PPC 遠伝子を クローン化すること及びし - リジン又はスレオ ユンを製造するために、前記遠伝子を進揺する 組換えプラスミドによりコリネパクテリウム減 の細菌を形質転換することを開示している。

これらの先行技術は、又、 C. メラセコーラ (melassecola)の ppc 遺伝子を選出する組換え プラス(P DNA により形質転換されたコリネペクテリウム・メラセコーラ株を明示している。 Cれらの株は、増大された PEPC 活性を示しているが、 アミノ酸 製造船が増大したことを示す 証拠は何もない。 (仏園出頭ボ2581655 号) Cれらの刊行物中には、コリネパクテリウム・グルタミクム (glutamicum) から分離された ppc 遺伝子をクローン 化することにより、 アミノ酸、 符にレーリシンの発酵による製造を高めるとの示唆は何もない。

(発明が解決しようとする課題)

本発明者は、コリネパクテリア又はプレビパ クテリアにかいて複数能を有する相応するペヒ クルに PBPC をコードする遺伝情報を導入し、 この遺伝情報を選撒する、生成したハイブリッドペとクルを相応するコリネペクテリア又はプレビパクテリア宿主又は受容体 (recipient) 中で復興させると、形質転換された微生物は、 レーフミノ酸、殊化、レーリジンのすぐれた生産体となるとの知見を得た。

本発明は、レーアミノ酸を高合量で生態する プレビバクテリウム及びコリネパクテリウム域 の多くの株を宿主として使用できるので、狭に 重調である。

このように、本発明は、しってミノ酸を発酵的に製造する方法に関し、さらに、この方法に関連する種々の遺伝的及び数生物学的エレメントに関する。例えば、本発明は、PEPCのための遺伝子の分離体、この遺伝子を含有し、上述の関中で複製しうる種々のペピクル(Venicle)、このペピクルを含む上記像生物の種々のマイクローブ、及びしってミノ酸の製造のための種々の発酵法に関する。

る。例えば、染色体 DNA とペクタープラス(ドを制限解析で消化 (digeot) し、続いて DNA リガーゼで処理するか、又は染色体 DNA とペクタープラスミドを制限解析で消化し、続いてターミナルトランスフェラーゼ、 DNA ポリメラーゼ 等により開發した末端を処理し、さらに引き続いて DNA リガーゼ 存により処理する。 (Methods in Enzymology 6 8 (1 9 7 9))

ppc 遺伝子を分離するために、C. グルタミクム ATCC 1 5 0 5 2 のゲノムバンクを、グラム酸性筒エシェリヒア・コリにかいてクローン化するために通常使用されるベクターであるプラスミド puc 1 8 中で譲成した。 ppc 遺伝子を相応する遺伝子にかいて影響された疑知の B. コリー契然変異株の相補により分離した。 段補クローンを分析し、遺伝子の後にソート (sought)を有する挿入断片 (inserts)を生盛することが遺伝的及び遊業的に示された。

グルタメート生産株で複数しりるペクターに 挿入された折しい DNA フラグメントを有する組 [練題を解決するための手段]

本発明は、C. グルタミクム株から分離された、ホスホエノールピルピン酸カルボキシターゼ (PBPC) の活性を有する蛋白質の製造をコードする情報である遺伝子配列を有する DNA フラグメントに関する。

供与体は、ppc 遺伝子中で突然変異したものか、又は、ppc 遠伝子の野性型のものであつてよい。この DNA フラグメントは、本質的に 3422 個の塩基対から成り、その末端で 8al I 削限酵素サイトに接続してむり、 PEPC の製造をコードしてかり、その N 末端 アミノ 飲配列は Thr1-Aap - Phe - Leu - Arg⁵- Aep - Aep - ILa - Arg - Phe¹⁰- Leu - Oly - Glo - ILe - Leu¹³ である。

PEPC をコードする構造遺伝子は、2757 個の塩基対から成る。

占紋 PBPC は、アセチル CoA により刺激され ない。 ppc 遺伝子から成る DNA フラグメントを 含有十る組換え DNA は、常法に従つて形成され

換え DNA 分子を超過するために、 ppc 遺伝子は、 使に B. コリー及びオリシナルのコリネパクテ リウム領主又はあらゆる辺のグルタメート生産 株化かいて増殖しりる、いわゆるプラスミドシャトルペクター (ペピクル) にサナクローンされた。 好に興味あるものは、 ペクター p2 1 及 び pcv 2 2 である。

プラスミド p2 1 は、コリネ遊グルクミン段 生産商及び E. コリーにかいて増殖しりるドラ イプユニット領域から成り、 1 契物に抵抗を示 す少なくとも 1 領域を有する。 p2 1 は、独選 特許出頭 5 7 5 7 7 2 9.9 号明細形に明示 されている。

pCV 2 2 は本質的に純粋なプラスミッドであり、 4.5 Kb の長さ及び的6 図に示した制限併象切断地図により特徴づけられるものである。

このペクターは、努託された改生物の何飽を、 現在の技術により前解 (Lyeing) することによ り得られる。

街住遊の又は突然安美型の ppc 遺伝子を含有

する租換え DNA は、既知の形質転換法により、 好ましくは、コリネパクテリウム又はプレビパ クテリウム異の敬生物中に導入することができ る。

これら数生物中にかいて複製しりるペピクルは、プラスミド pDM 2 又は pDM 6 である(第 5 図及び第 7 図の割段研集地図に図示)。

C. グルタミクム、C. メラセコーラ、B. ラクトフアーメンタム及びB. フラパム (B. flavum)は、受容体又は信主として好ましいものであり、とりわけ、アミノ酸製造のために既知のものが好ましい。

形質転換された株中にかいて ppc 遺伝 又はた株中にかいて ppc 遺伝 又は大力では、コリネパクテリウム 又は 又は ない 知知 なっとが 知られて もる。 それらは、この株にもともとは してっし を は 伝子の 発現を コントロール するプロモーター である この株の 内在性 プロモーターである しょた、外来性のプロモーターであり、

なレベルに調節した媒質中で好気的条件下に行われ、レーブミノ酸の形成が終了する迄のけられる。好ましい超級にかいて、形質転換されたコリネパクテリウム・グルタミクムを使用し、1988年7月8日のブダベスト条約の規定の下に、ドイン酸生物等託扱機 (DSM) に寄託されたコリネパクテリウム・グルタミクム DSM 4697と同一の特徴を有するものから選ぶ。

媒質中に書版されたアミノ像は、常法により 採取される。この発明の方法により、レーブミ ノ酸、森にレーリジンは、プレピパクテリウム 及びコリネパクテリウムの人工の突然変異体を 使用する近知の方法にかける収量よりも、高い 収貨で生産することができる。

(兴. 施 例)

この発明を一般的に配述したが、特定の実例をお照することにより一層理解されるであろう。 かかる実例は、説明を目的とするだけであつて、 特に明示されない限り、この発明を限定するも のではない。 これらのプロモーターには ptac、plac、ptrp、ファージ A の PR 及び PL を挙げることができる。 この発明のもう 1 つの目的は、 珠にしーリジン、 レーメテオコン、 レースレオコン、 レーイソロイシン、 レーグルタメート、 レーグルタミン、 レープロリン、 レーアルヤニン、 レーシトルリン及びレーオルコテンから過ばれるアミノ酸、特にレーリジンの製造する方法である。

コリネパクテリウム、グルタミクム ATCC
 5052 ppc 速伝子の分離

転換された微生物の培養は、出及び態度を適益

1.1. C. / N / E / A ATCC 1 5 0 5 2 0 7 / ムペンクの構成 C. グルタミクム ATCC 1 50 32 の DNA の全盤を Chater らが配数のようにして (Curr. Topics Microb. Immunol. 96, 69 pp (1 9 8 2)) 分離し、 Sau 3AI 化て部分 的化梢化させた。 4~20 Kb の大きさのフラ クメントを低格融点アガロースから精製した。 Cの DNA 俗放を2リットルのTB稜術被 (Tris 1 0 mM、BDTA 1 mM) で透析させた。 2 mg の サイズフラクションされた染色体 DNA を、Bam HI で消化され、アルカリホスファメーゼで処 題されたプラスミド pUC (Yanish-Perron, C 5, (1985) Gene 55, 105 pp) 1 дB を有するT4 DNA リガーゼを使用して、接 鋭 (ligated) させた。 E. コリーNM522 (Gough, J.A and Murray, N.E. (1 9 8 3) J. Mol. Blol. 1 6 6 , 1 pp) & Hanahan の方法(J.MO1、Biol、1 6 6 . 5 5 7 pp、

(1985)) に従つて接続 (ligation) 弘合 物を用いて形質転換させ、形質転換体を、アン ピシリン(100 mg:/ml)及び5-プロモニ 4-クロロ・インドリル・β・ロ・ガラクトゼ ラノシド(X-gal、5 Dag/el)を含有するLB 果天板 (Davis, R.W. 5 (1 9 8 D) Advanced Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory) 上でも7つにて選択した。808のクローンは X-gal 板上で無色であり、挿入された DNA の 存在を示した。より詳細にクローニングの効率 を定録するために、46個の無色のクローンか 5のプラスミド DNA を削限解案の前化により試 終した:78のクローンは抑入断片を有してい なかつた。4180クローンは、平均サイズが 0.5 Rb の小さな挿入断片を含んでいた。 5 2 **ものクローンは、 1.3 5 Kb から 8.5 Kb に 互り、** かつ平均サイズが 5 kb の挿入断片を有してい

NM 5 2 2 株の形質転換により合計 1 0 のクローンが得られた。これらのクローンを 4 系統

した。このプラスミド(pTG 1 2 0 0) は、pUC 1 8 と約 5 kb の挿入断片から解成されている。pTG 1 2 0 0 0挿入の制限酵業地図を、
第 1 図に示す。pTG 1 2 0 0 による XH 1 1 の
再形質転換は、ppc 契然変異の相構につながる。
サザン・ハイプリッド形成 (Southern hybridication) (Maniatis, T. 5、 (1982)
Molecular Cloning, Cold Spring Harbor
Laboratory)は、C. グルタミクム ATCC
1 5 0 5 2 の染色体 DNA がpTG 1 2 0 0 にかい
てクローン化されたことを確認した。
1.5. クローン化 DNA フラグメント上のppc 進

ppc 遠伝子をりまく周在させるため、サプクコーニング実験を行なつた。 Sal I による pTO 1 2 0 0 の前化は、 5.5 kb の内部フラグメントを生成した(第1図)。 Bal I により前化された pTO 1 2 0 0 は、 Bal I 切断 pBR 5 2 2 (Bolival. P 5、 (1974) Gene. 2, 9 5 pp) 金用いて接続させた。再級統された

伝子の周在

(Cg8A , Cg8B , Cg8C 及び Cg8D)にプールし、 CeCs - BiBr 密度勾配速心分離によりプラスミド DNA を誤殺した。

1. 2. ppc 遺伝子のクローニング B. コリー XH 1 1 (Mountain A. 6, (1 9 8 4) Mol. Gen. Genet 1 9 7 。 8 2 pp) の適切な細胞を 5×200町の各系統のC.グルタミクムの遺 伝子パンクを用いて形質転換させた。形質転換 逃合物を、アルヤニン(50 as/st)及びア ンピレリン(100 μg/ml)を加えた Mg 殊天 (Miller, J.H. (1 9 7 2) Experiments in Molecular Genetice . Cold Spring Harbor Laboratory)及びアンピシリン(100 mg/ ad)を加えたLB上に拡散させた。 アンピシリ ン磁加LB上にかいて、104/#8 の形質転換 頻度が得られた。 CgSD 系による形質転換から、 アルギニンとアンピシリン含有 Mg 果天上で 108のクローンが分離された。分離された DNAの制限酵素による前化は、すべてのクロー ンが同一のプラスミドを含有していることを示

pTO 1 2 0 0 分子を設置させるため、 极終反応 協合物を XbaI で消化させた。 E. コリー XH 11 をこの接続反応協合物で形質転換され、 アルギュンとアンピンリンを含有する Mg 寒天上に虚 布した。 相補クローンのプラスミド DNA を試験し、 pBR 3 2 2 と pTG 1 2 0 0 の 5.5 kb 8a1 Iフラグメントから成ることが発見された。 構成されたプラスミドを、 pTG 1 2 0 1 と命名し(第 2 図)、 相応する株を XH 1 1 / pTG 1 201と命名した。

1. 4. C. グルタミクム ppc 遺伝子による、 C. グルタミクム ATCC 1 5 0 5 2 、 及び DNA マラ グメントを含有する組換プラスミドを選択する B. コリークーロンにかける酵素活性の顔定

ボスホエノールピルピン酸カルポキシラーゼ 活性を、C. クルタミクム ATCC 1 3 0 3 2 及び E. コリコ株 XH 1 1 / pTO 1 2 0 1 で御定した。 B. コリー株 MM 2 9 4 (Hanahan, D. 6、 (1 9 8 3) J. Mol. Biol. 1 6 6, 5 5 7 pp)をポリテイナのコントロールとして、XH で 歌奏物を、成育の定常期の初めに遠心により 採取し、100 mMのTrie / HCs (出 7.5) 及 び 1 mMの DTT で構成された緩衝液で 5 回洗つ た。細胞の分解はガラスピーズ粉砕器 (MSR ホ モゲナイザー: B. Braun Meleungen, PRG) で 行つた。透明な上紙み数中での PEP カルボキシ

1 2 0 1 プラスミド中に含まれた 3.5 kb の Sal I DNA フラグメントは、ホスホエノール ピルピン飲カルポキシラーせ遠伝子をコードし ていることを確認できる。

好に、 B. コリーからロホスホエノールピル ピンはカルポキシラーゼを刺放する(Izui. K. 5. (1981) J. Biochem. 90.1321 pp)、かつナレビパクテリウムフラパム (Ožaki, H. 5 (1 9 6 9) J. Biochem. 6 6. 297 pp)からのホスホエノールピルピン酸 カルポキシラーゼを刺激することが知られてい るアセテル・ CoA の作用を検討した。 餌1 長に 示された結果から、 C. グルタミクム ATCC / 3022からのホスホエノールピルピン鍛カル **ポャッラーゼは、本来の宿主中で生産されたも** のも、XH 1 1 / pTO 1 2 0 1 株を形成するた めに、 B. コリーにクローン化した結果として 生立されたものも、上述のアツセイ条件下では フセナル - COA 化より刺散されないことは明ら かてもる。

ラーで活性を、100 mM Trie / HCs (pH 7.5); 0.8 Mの銃破アンモニウム:1 mM DTT で広く 遊析を行つた後れ砌足した。変性マレートデヒ ドロゲナーゼ組合セアツセイ(Ozaki, H and Shiio, J. (1 9 6 9) J. Biochemistry 66. 297 pp)を使用し、NADH の消失を340 nm で光学的に追跡した。このアツセイ磁合物は、 1mの放終容徴中に次の成分を含有していた: 6 mM PEP ; 1 0 mM NaHCOs ; 1 0 0 mM Trie/ HC & (H 7.5); 0.1 5 mM NADH; 2 U / m8 -レートヂヒドロゲナーゼ(ブタ心臓); 3.5 mM Mn80。及び PEP カルポキシラーゼ調製物。 Ma++ の磁加による反応の開始前に非特異的な NADH 分解物を測定した。蛋白質機度は、 Lowry **らの方法(Lowry. O.H. ら、(1951)J.** Biol. Chem. 195, 265 pp) 又は Bradford らの方法 (M.M. Bradfovd (1 9 7 6) Adalyt. Biochem. 7 2. 2 4 8 頁)で測定した。第1 丧に示されたデータから、 C. グルタミクム ATCC 1 5 0 5 2 よりクローン化され、 pTC

第 1 喪 C. グルタミクム及び異なるB.
コリー株から得られ透析された
ホモゲネート中のホスホエノー
ルビルビン酸カルボキンラーゼ
活性

枠	ホスホエノールピルピン銀カルポ キシラーゼ活性(U/呼張白質)		
	ナセチル・COA がないもの	0・2 mMアセチルー CoAの存在において	
C. / P & / A ATCC 1 5 0 5 2	0.226	0.225	
E. = 1 - 104 294	0.035	0.158	
E. = U - XH 1 1/pTG 1 201	1.010	1.090	
E. = 9 - XH 11	0.0	0.0	

2 C. グルタミクム ATCC 15052の ppc 遺伝子のスクレオテド配列の決定 pTG 1200の金5 kp 挿入フラグメントのスクレオテドの配列を、ショットガンアプローテ (Messing, J. 5、(1981) Nucleic Acids Res. 9, 509 pp)を使用して決定した。

pTO 1 2 0 0 0 8ma I + 1 + 6. pTO 1 2 0 2 と呼ばれる折しいプラスミドを生産するために、 平清断端 (bluntended) オリゴマー (GTOTCTACA-OTO) のクローン化化より XbaI サイトで伝染し た。 1 0 mg の pTG 1 2 0 2 の 5.0 kb Xbal 挿 入フラグメントを低温溶放性のアガロースから 材製した。このフラグメントを、T4 DNA りダ ーゼを使用して再循環させ、音放処理によりラ ンポムに断片化し、最後に各々 2 mM の dATP、 dOTP、dCTP 及び dTTP の存在下でクレノウ (Klenow) ポリメターせを使用して平滑断端化 した。 500~800 bp の大きさのフラグメ ントを低温存融アガロースから分離し、 SmaI 消化 M 1 5 mp 8 ファージ (Messing. J and Vielra. J. (1 9 8 2) Gene 1 9. 2 6 9 ~ 276)により接続させた。160のクローン がチェーンターミネーション法(Sanger. P. 6, (1977) Proc. Natl. Acad. Bci, USA 74、5463頁)により配列決定され、コン ピューメを使用した分析(DNASTAR、IDO, 1801, University Ave, Madison, WI 5 3 7 0 5, USA, 7 4, 5 4 6 5 pp) により重複クローンが同定された。 C. グルチミクト ATCC 13032 の ppc 法伝子を伝える pTG 1 2 0 2 中に含まれる挿入された DNA フラグメントの全配列を、 群る固に示す。 ホスホエノールピルピン酸カルポキンラーゼに対応する予想されるアミノ酸配列が対応する DNA 配列の下に示されている。

決定された金配列の投さは4 8 8 5 bp である。張白賀をコードしている領域の検案では、 提開放航み枠 (long open reading frame; ORP)が B. コリーからの ppc 遺伝子の配列 (Fujita, N. 5 (1984) J. Biochem, 9 5。9 0 9 pp)及び他の間(Ratagiri, P 6、(1985) Gene 3 8, 2 6 5 pp and I tui, R. 6(1986) Nucleic Acide Ree, 1 4, 1 6 1 5 pp)の ppc 遺伝子の配列と相同性を示し、この ORF は PBP カルポキシラーで遺伝子をコードしていることを示していることがわかつた。この ORP は、pTO 1 2 0 1 中でクローン化された、6 5 2 ~

4077のコーディネートの間に広がる 5.5 kb 8a1 I DNA フラグメント内に含まれている。配列分析では、それぞれ 919又は 92 4 心 アミノ酸から成る 嵌白 質生成物を与える 2 つの可能 な納択の出発サイト (コーディネート 92 1 及び 906) を確認した。

2. 1. PBP カルボキシラーゼ 蛋白質の N 末満配 列の決定

ppc 遺伝子生成物の開始コドンを精密化同定 するために、 PBP カルポキショー ぜ渡白質の N 末端アミノ象配列を決定した。

C. グルタミクム ATCC 1 3 0 5 2 からの PEP カルボキシラーゼの精製を、ガラスピーズ M8K - 粉砕器を使用して細胞を破壊した後に行つた。 0 ~ 3 多の健康ストレプトマイシンにより複殺を沈殿させた後、分闘化された健康アンモニウム(0~5 0 多及び50~7 0 ま) 沈殿を行つた。 5 0~7 0 多健康アンモニウム沈緑から再解させたペレットを出路緩衝被(20 mM Trie / HCs ell 7.5; 1 0 0 mM (NH₄) 2804; 1

mM DTT) に対して透析させ、さらにQセファ ロース返流上でイオン交換クロマトグラフィー で精挺した。その後、機能 PBP カルポキシラー せ分面を、セフアクリルBSOOスーパーフア イン (Sephacryl 8 3 0 0 superfine)上でか ルー濾過し、潜出は安定化級衝放(100 mM Tris / HCs pH 7.5; 8 0 0 mM (NH4):804; 1 mM DTT)で行なつた。最後に、試料をプルー セフアロース上でアフイニティークロマトグラ フィー工程で処理し、L・アスパルテート (70 mi)を使用して辞出させ、アスパルケ ートを除去するために安定化設衡液で透析した。 8DS - PAGE で均一であるととが確認された PEP カルがキシラーゼ分面を次いてスピード・パク (apsed-vac) 旋縮根を5℃で使用して約4倍に 勝材した。

8400でミコン農総役(Amicoa)で最終容役
1.5まで機能した。この造場を2回繰り返した。
機能されたのでは3個の2配のエッペンドルフ管に分けた。次に、各エッペンドルフ管にエタ
ノール(2配)を加えた後、一80℃で48時
め、一80℃に冷却されたエタノール/水
(80/20 v/v)で2回洗浄した。域料をず
サイクル(precycle)フィルターにかけた。配
列決定は、オンライン120APTH分析後により、アプライド・パイオンステム(Applied
Biosystem)470A蛋白質配列決定後にて実施した。

その配列は次のとかりである:

Thr1- Asp - Phe - Leu - Arg5- Asp - Asp - ILe - Arg - Phe - Leu - Gly - Gln - ILe - Leu15

この結果は、 PBP カルポキンラーゼが、 921 位の ATG コドンとろも 7 8 位の TAG コドンの間

4242とじてドイツ酸生物舒託機関に沓託されている。

3.2. ppc 遺伝子の C. グルタミクム/ B. コリ - シャトルペクター p2 1 へのクローン化 プラスミド pTO 1 2 0 0 を、E. コリー XH 1 1 / pTO 1 2 0 0 から分牒し、 Sau 5 A で部分的 で消化し、DM 2 7 2 - 5 (=D8H 4 2 4 2) から分位されたプラスミド pZ 1 を Bgl II で級 形化 (linearized) した。双方の DNA を混合し、 T 4 DNA リガーせで仮视させ、この姿態症合物 f. B. コリーXH 1 1 を形質転換するために使 用した。形質転換体を、アルヤニン(50μ8/ 起)及びカナマイシン(10 дв/毗)を含有 **するw9寒天上で遊択した。 XH 1 1 / pDM 2** と呼ばれる形質転換体の1つからのプラスミド - DNAを分離し、削限係素地図により特象づけ た。 pDU 2 の構造は、第 5 図に示されている。 酵素剤足により、 XH 1 1 / pDM 2 徐が、 XH 11 / pTG 1 2 0 1 株について第 1 表に示したとか り、アセチル - COA Kよつては別欲されない。

に 広がる9 1 9 値のアミノ酸の ORF によりコードされていることを示している。 湖始コドンは、推定のシャイン・ダルガルノ配列から約1 4 塩齢対下咙に存在する(コーデイネート900~908、祭5図)。

3. c. グルタミクム ATCC 1 5 0 5 2 中にかける c. グルタミクムからの ppc 遺伝子のクローン 化及び 免別

3.1 C. グルタミクム/ B. コリーンヤトルベ クター p2 1 中構成

プラスミドシャトルペクター p2 1 の構造は、第4回に示されている。 C れは、 B. コリーペクター pACYC 1 7 7 (Chamg. A.C.Y 及びCohen. B.N. (1978) J. Bact. 1 5 4. 1 1 4 1 pp)から、及びC. グルタミクエプラスミド pHM 1 5 1 9 (Miwa. K. (1984) Agric. Biol. Chem. 48, 2901 pp)から、ドイツ特許な 5 7 5 7 7 2 9.9 号明細書に記載のように構成された。 プラスミドペクター p2 1 を含有する E. コリー洙 DM 2 7 2 - 5 は、DSM

(抑2数)ホスホエノールビルピン駅カルポキ ショーゼ活性を有することがわかつた。

部 2 段 C. グルタミクム ATCC 1 5 0 5 2 及び B. コリー棟 XH 1 1 と XH 1 1 / pDM 2 から得られる遺析された ホモゲオートにむけるホスホエノー ルビルビン酸カルポヤシラーゼ活生

A	ホスホエノールピルピン収カルポキッ ラーゼ活性 (U/物 ※ 白)		
V .	アセチル- COA _. なし	D.2mMアセチ ル・CoAの存在下	
C. / N # 1 / L ATCC1 5052	0.226	0.225	
E. = 0 - XH 11	0.0	0.0	
B. = U − XH 11 /pDM 2	0.261	0 - 27 2	

3.3. C. グルタミクムペクター pCV 2 2 の構成 C. グルタミクム ATCC 1 3 U 5 8 から分離さ れたプラスミド pHM 1 5 1 9 (Miwa. K. 6 (1 9 8 4) Agric. Biol. Chem. 4 8, 2901 pp) を Bgl II で切断し、 Bam HI で切断された puc 8 (Vieina, J and Messing, J (1982) Gene 1 9, 259 pp) 磅導体 p8VB 2 1 (Arnold. w. 5, Gene (1 9 8 8) 7 0, 171 pp) 化接続された。この接続混合物を、 E. = 0 - 株JMB 5 (Vieira, J and Messing, J. (1982) Gene 19, 259 pp) を形 質転換するために使用し、形質転換体をアンピ **シリン含有LB※天上で選択した。形質転換体** の1つからプラスミド DNA を分離し、 PBC8 100と称した。 Ta 5 のカナマイシン抵抗性 の遺伝子(Jorgensen, R.A. 5(1979) Mol. Gen. Gen. 1 7 7 . 6 5 pp) # Tn 5 & 運搬する pACYC 1 8 4 (Coan, A.C.Y and Cohen, S.N. (1 9 7 8) J. Bact. 1 5 4. 1141 pp) 胡導体から、 XhoI - Sal I DNAフ ラクメントとして分離し、 pBC8 1 0 0 0 8al I サイトに挿入して pECS SDDを形成させ、こ れを、形質転換 (Yoehihama, M ら (1 9 8 5) J. Back. 1 6 2 , 5 9 1 pp) K I 9 C. J. メミクム ATCC 1 3 0 3 2 に移した。

 3.4. ppc 遺伝子の C.グルタミクムペクター pcv 2 2 へのクローン 化

具化エナジウム CeCs 密度勾配 这心分 順法に より B.コリー XH 1 1 / pDM 2 徐からプラスミ ド pDM 2 を分離し、 Yoebihama 6 の配畝のよう にして(J. Bact. 1 6 2、5 9 1 pp (1985)) C.グルタミクム ATCC 1 3 0 3 2 を形質転換す るために使用した。形質変換体の1 つからプラスミド DNA が分離され、 pDM 2 の構造をもつこ とが利つた。

8a1 I で切断された ATCC 1 5 0 5 2 / pcV 2 2 からプラスミド pcV 2 2 を分離し、子ウシの島アルカリホスファターせにより処理した。プラスミド pDM 2 を 8a1 I 及び 8ma I で切断した。 両方の DNA を混合者が、 T 4 DNA リガーゼにより接続させ、この接続混合物を C.グルタミクム ATCC 1 5 0 5 2 を形質販換するために使用した(Yoshihama、M. 5 (1985) J. Bact. 162、591 pp)。形質転換体の1つからpDM 6 と命名されたプラスミド DNA を分離し、

8ma I で消化された ATCC 1 5 0 5 2 / pECS 5 0 0 株からプラスミド pECS 5 0 0 を分離し、呼び級號させ、 C. グルタミクム ATCC 1 5 0 5 2 でが質転換するのに使用した。 この形質転換体の 1 つからプラスミドを分離し、制限解準地図により特徴づけ、 pECS 5 5 0 と称した。

β-90タマーゼ抵抗性遺伝子を含有する R.
コリーのレプリコンを pBC8 5 5 0 から HIad II
での前化、再接疣及び形質転換により削除して、
C. グルタミクムペクター pCV 2 0 を構成した。
プラスミド pCV 2 0 を Bma I で消化し、 B.コリー Lac 2 プロモーター及び多クローン化サイトを選出する pUC 1 9 の 0.5 2 2 kb Pvu II フラグメントと接続させた(Yanisch-Perron, Cら(1985) Gene 5 5、10 5 pp)、C.グルタミクム ATCC 1 5 0 5 2 を、この接続場合物で
形質転換させた。プラスミド DNA を形質転換体の1つから分離し、pCV 2 2 と命名し、その構造を制限解素地図により確認した。上述の構成

削跌避業地図により特敬づけた。 pDM 6 の构造 は併7図に示されている。

を有する pCV 22構造体を組6 図に示す。

3.5. ppc 遺伝子と共に DNA フラグメントを有ける継续プラスミドを逃避する C.グルタミクムクローンにかける酵米活性の劇定、 C.グルタミクム株 ATCC 1 3 0 3 2 / pDM 2 及び ATCC 1 3 0 3 2 / pDM 6 中でホスホエノールビルビン復カルボキシラーせを測定した。結果を紹る表に示した。

第 5 喪 種々のC.グルタミクム株から得られた遺析されたホモゲネート中のホスホエノールピルピン殴カルボキシラーゼ活性

C. グルタミクム株	ホスホエノールビルピン 欧 カルポキシラー ピ活住 (U/W - 安白)	
	アセチル- Co人の非存在下	
ATCC 1 50 5 2/pCV 22	0 - 250	
ATCC 1 5 0 5 2 / pDM 2	0.240	
ATCC1 30 3 2/pDM6	0-996	

 オラスミド pDM 6 の pEP カルポキシラーゼ 低性及びリジン分泌体でクルタミクム DM 58-1 のリジン分泌化対する作用

C.クルタミクム株 D N 5 8 - 1 は、株 ATCC 1 5 0 5 2 の結事体であり、 5 0 mM の L - リシン類似の B - 2 - アミノエテル - DL - システインに抵抗性であり、通常の N - メテル - N' - ニトロ・N - ニトロングアニジン 変異酵 発により得られる。

プラスミド PDM 6 と対照としてのプラスミド PCV 2 2 を C.グルタミクム D M 5 8 - 1 中に導入して、 DM 5 8 - 1 / PDM 6 及び DM 5 8 - 1 / PCV 2 2 を生ぜしめた。 株 DM 5 8 - 1 / PDM 6 は DSM 4 6 9 7 としてドイン酸生物 寄託 機関に移託された。 特異的 な PEP カルポキシラーゼ活性及び分泌されたリジン 濃密ならびにショ琥桐提載を制定して得られた結果を稱 4 契に示す。

分記されたリジン吸度に対するプラスミド pDM 6 のクローン化された ppc 遺伝子により違

配を含有し、へこみ部を有する100mのフラスコ中で培養を行つた。DM 58-1/pCV 22とDM 58-1/pDM 6株の場合には、この媒質は20μ8/配のカナマイシンを含有した。培養を50℃、500 spm で 48 時間実施した。培養経了後、培養上母み放中のリジンをイオン交換クロマトグラフィー及びニンとドリン検を使用するアミノ銀分析法により定量的により定した。ヘキソキナーせ及びグルコース・6-ホスフェートデヒドロゲナーせと組合せたインウェフェートデヒドロゲカーでと組合せたインウはのにサンカロースを測定した(Technicon Application Note AAII:サッカロース及びグルコース)。

5. B. フラパム DM 5 6 8 - 2 株のスレオニンとイソロイシン分泌に対するプラスミド, pDM 6の作用

B.フラペム株 DM 5 6 8 - 2 は株 ATCC 14067 の誘導体であり、 4 9 / W の スレオニン類似の α - アミノ - β - ヒドロキシ音草酸に抵抗性で

成される高められたレベルの PEP カルボキシラーゼの刺激効果及び、特に、消費されたサッカロース世島たりの形成されたリジン量である収置に対する刺激効果は明らかである。

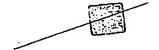
第 4 表 C.グルタミクムによるリジン分泌に 対する PEP カルボキシラーゼの増加 されたレベルの効果

	8 1676 5	- 707 1.1	
株	PEPカルポキシ ターゼ活性 (U/kg 蛋白)	分泌された L-リジンの 満度(8/8)	収量 L-リジン(g) サッカロース (g)
C. # * * * 0 A DM 58 - 1	0.275	16.1	0.170
C. INSEPA DM58-1/ pCV 22	0.240	15.9	0.175
C. JRF E DA DM 58 - 1/ pDM 6	0.955	17-9	0.198

1 2 8 / B の 成 酸 アンモニウム、 2 4 0 8 / B の 結 み つ、 6 0 ml / B の 大 豆 張 白 水 解 物 及 び 1 0 8 / B の 炭 酸 カル シ ウム か ら 成 る 蘇 質 1 0

もり、通常のN-メテル・N'-ニトロ・N-ユトロングアニジン突然変異誘発の優で得られる。
C.グルタミクム DM 5 8 - 1 / pDM 6 (二DSM 4 6 9 7) からプラスミド pDM 6 を分離し、B.フラバム DM 3 6 8 - 2 に導入して、DM 3 6 8 - 2 / pDM 6 株を得た。 DM 5 6 8 - 2 株を DSM 5 3 9 9 としてドイン 微生物 お託 假調 に 寄託した。 分泌されたし - スレオニン及びレ・イソロインンの機度及びショ 額 補 役に与えるプラスミド pDM 6 の作用を銀 5 表に示十。

分泌されたスレオニンとイソロイシン機関に対する、プラスミド pDM 6 中に含有されるクローン化された ppc 遺伝子の刺激作用及び特に、開設されたサッカロースの遺に対する形成されたアミノ酸量である収量に対する刺激作用が明らかである。



特別平2-291276 (11)

郡 5 段 B.フラパムにより分配されたスレオ エン及びイソロイシンに対する PDM 6の効果

株	分泌された アミノ W	分泌された アミノ放戦度	収 粒 アミノ酸(g) サンカロース(g)
B. フラパム DM 368-2	L-スレオニン	5.52	0.0524
	レーイソロイジ	ン 0·92	0.0090
B.フラペム DM368-2	レースレオニン	3.77	0.0570
/pDM 6	L-イソロイS	ンン1・08	0.0106

既 5 図は pDM 2 の 制限辞業 地図でもり、 第 6 図は pCV 2 2 の 確成及び 制限酵素 地図で もり、

前7凶は pDM 6の制限酵素地図である。

代理人 弁理士 矢 野 敞 1



この培養は、4 化記載したよう化して実施した。

4 凶面の耐単な説明

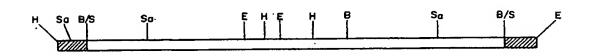
第1 図は pTG 1 2 0 0 の歩入の制限酵業地図であり、

第2図は pTG 1 201の制設酵来地図であり、 第3図は ppc 遺伝子を有する pTG 1 200 に 挿入された DNA フラグメントのヌクレオテド配 列を示す図であり、

第4回はp21の制限酵素地図であり、

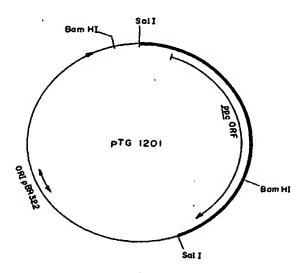
白色棒部… 5 kb 挿入断片; ダッシュのある棒部… pUC1 8ペクターのポリリンカー H… Hind III;Sa… SalI;B… BamH I;E… E coR I;B/S… BamH I/ Sau3 Aハイブリッド

. I Kb



F 1 G. 1

太優部… ppc ORFを生産する3.5 kb Sallフラグメント。 細磨部… pBR322ペタター、一41テトラサイタリン抵抗性決定等のプロモータの位置及び方向を示す。



F I G. 2

	FIG.3(1)
GATCACCAGCAGGCAATCGGCACTGTTCAGAAGCTTGCATTCGCCCTTCCAAAGGAATACTTCGAGAAGGTTGACGTTGCAGTCACCGTTCCTTTCACTG	
****,*******,********,*******,********	100
ACATECGGTCCGGCAGAGTCTGGTTGAGGGGGAEAAGCTTGAGGTCACTTTCGGTGCTGAGGACGTCTCCCAGCACGAGTCCGGTGCGTACACCGGTGA	
****,**********************************	500
AGTTTCTGCAAGCATGCTGGCAAAGTTGAACTGCTCTTGGGTTGTCGGTTGGACACTCCGAGCGCCGCGAGTACCACAACGAGTCTGATGAGTTGGTTG	
	300
. GEGAAGGCAAAGGCACCTCTGTCCAACGGCATCAGCCCGATCGTCTGCGTCTGGTGAGCCACTGGAAATCCGTGAAGCTGGCACCCACGTTGAGTACGTCG	
	400
TCGAGCAGACCCGTAAGTCCCTTGCTGGCCTGGATGCTGCTGAGCTGGCCAACACCGTTATCGCGTATGAGCCAGTGTGGGGCTATCGGCACCGGTAAGGT	:
1CGAUCACACCCT TOCTOBE TOCTOBE TOCTOBE TO TOTAL T	500
TGCTTECGEAGCTGACGCTCAGGAAGTGTGCCAAGGCTATCCGCGGGTCTGATCGTGGAGCTTGCAGGCGACGAGGTCGCTGAGGGGCCTGCGTATTCTTTAC	
TGCTTEEGEAGE GACGE LAGUAGE TE LAGUAGE TA CONTROL CONTR	600
GGTGGTTCTGTTAAGGCAGAACCGTCGCTGAGATCGTCGGTCAGCCTGACGTCGACGGCGGACTTGTCGGTGGCGCTTCCCTCGACGGTGAAGCATTCG	•
,	700
CCAAGETGGGTGCCAAEGETGCGAGEGTTGCTTAAAGTAEAGAGETTTAAAGCACAGECTTAAAGCACAGCCTTAAAGCACAAGCACTGTAGAAGTGCGG	
,	800
TTTTGATGAGCCCATGAAAGCCATCGAAATCAATCGCCCAGCTAAACACCTGTTTTGCTGGGTGATTTTTTATCTCATGCACGCCAACACCCTCAATGTG	
	900
AMEAGTGTTTAMGTAGTTATGACTGATTTTTTACGCGATGACATCAGGTTCCTCGGTCAAATCCTCGGTGAGGTAATTGCCGGAACAAGAAGGCCAGGA	
m to fire definition (locy is equope	
	1000

特別平2-291276 (13)

F1G.3(2)

·	F 1 G. 3(2)
GGTTTATGAACTGGTEGAAEAAGEGEGEGETGACTTETTTTGATATEGGCAAGGGEAACGCEGAAATGGATAGECTGGTTEAGGTTTTGGAGGGEATTACT	
vyelveqarltsfdiakgnaemdslyqvfdgit	
vyelve qarl t s t d t a t 9 n a s m d a t	1100
A A 6, f A 6 d 9 L f 2 2 1 0 1 9 2 3 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	
CEAGCEAAGGEAACACEEATTGCTCGCGCATTTTCCCACTTCGCTCTGCTGCTAACCTGGCGAAGACCTCTACGATGAAGAGCTTCGTGAACAGGCTC	
pakat piarafsh tallan lacaritation	1200
TEGATGEAGGEGACACECCTECGGACAGCACTETTGATGECACCTGGCTGAAACTCAATGAGGGCAATGTTGGCGCAGAAGCTGTGGCCGATGTGCTGCC	
TEGATGCAGGCGACACCECTECGGACAGCACTELTIAATGELACETGGCTGACCACTACTACTACTACTACTACTACTACTACTACTACTA	
dagdtppdstldatwlklnegnvgaeavadvlr	1300
dag ot p p o s t t o a t a t x t	.200
	•
CANTOCTGAGGTGGCGCCCGGTTCTGACTGCGCACCCAACTGAGACTCGCCGCGCACTGTTTTTGATGCGCAAAAGTGGATCACCACCCAC	
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
naevapvitanptettittanptettitti	1400
CGCCACGCTTTGCAGTCTGCGGAGCCTACCGCTCGTACGCAAAGCAAGTTGGATCGAGAAGAACATCGGCCGTCGCATCACCATTTTCTGGCAGA	
The lase ptertask ldeicknierritikust	
rhalq saeptartq skloelekii	1500
CEGEGTTGATTEGTGTGGCEGECCAEGTATEGAGGACGAGATCGAAGTAGGGCTGCGCTACTACAAGCTGAGCCTTTTGGAAGAGATTCCACGTATEAA	•
8 1 1 r v a r p r 1 e d e t e v d v v v v v v v v v v v v v v v v v	1600
ECGIGATGIGGETGTIGAGCTTCGTGAGCGTTTECGCGAGGGTGTTECTTTGAAGCCCGTGGTEAAGCEACGTTECTGGATTGGTGGAGCCACGACGAC	
rd v a v e t r e'r f g e g v p t k p v w k p g s u i g g d h d g	
rdvsvetrerfgegvptkpv4kpa	1700
,	
•	
	F1 G.3(3)
AGCTEAGCCTGTCGGACCGCATGAATAAGGTCAECCCGCAGCTGCTTGCGCTGGCAGATGCAGGGCACAACGACGTGCCAAGCCGCGTGGATGAGCCCTTA	F I G.3(3)
AGCTCAGCCTGTCGGACCGCATGAATAAGGTCAGCCCGCAGCTGCTGCTGCCGCGGCAGATGCAGGGCACAACGACGCCAGCCGCGCGGGATGAGCCCTTA	
ls is drank v t p q i i a la dag h n d v p s r v de p y	
L s L s d r m n k v t p q L L a L a d a g h n d v p s r v d e p y	
TEGACGECGTECATGGCGTTCGEGGACGTATCCTCGCGACGCCGACGCTCATCCGCCAAGGACGTCTTGAGGGCGTTTGAGGGCTCTTTACT	1900
TEGACGECGTECATGGCGTTCGEGGACGTATCCTCGCGACGCCGACGCTCATCCGCCAAGGACGTCTTGAGGGCGTTTGAGGGCTCTTTACT	1900
L s L s d r m n k v t p q L L a L a d a g h n d v p s r v d e p y	1900
to the dramak with political and any hind which we deply to to the total and the control of the	1900
TCCACGCCGCCGTCCATGGCGTTCGCGGACGTCATCCTCGCGACGACGCCGAGGACGCCGAGGACGCGCGTGAGGGCGTGAGGGCGTTTACT TO A V h g V r g r i l a t t a e l i g e d a V e g V w f k V f t	1900
TCGACGCCGCCGTCCATGGCGTTCGCGGACGTTATCCTCGCGACGACGGCCGAGGACGCCGAGGACGCCGCTGTGAGGGCGTTCAAGGTCTTTACT TO A V h g V r g r i l a t t a e l i g e d a V e g V W f k V f t CCATACGCATCTCCCGGAGGATTCTTAACGATGCGTTGACCATTGATCATTCTTCTGGGTGAATCCAAGGACGTTCTCATTGCCGATGATCGTTTGTCTG CCATACGCATCTCCCGGAGGATTCTTAAACGATGCGTTGACCATTGATCATTCTTCTGGGTGAATCCAAGGACGTTCTCATTGCCGATGATCGTTTGTCTG	1900 2000
TCCACGCCGCCGTCCATGGCGTTCGCGGACGTCATCCTCGCGACGACGCCGAGGACGCCGAGGACGCGCGTGAGGGCGTGAGGGCGTTTACT TO A V h g V r g r i l a t t a e l i g e d a V e g V w f k V f t	1900 2000
TCGACGCCGCCGTCCATGGCGTTCGCGGACGTTATCCTCGCGACGACGGCCGAGGCTGATCGGCCAGGACGGCCGTTGAGGGCGTTCAAGGTCTTTACT T a v h g v r g r i l a t t a e l i g e d a v e g v w f k v f t CCATACGCATCTCCGGAAGATTCTTAAACGATGCGTTGACCATTGATCATTCTTGTGTGAATCCAAGGACGTTCTCATTGCCGATGATCGTTTGTCTG p y a s p é e f l n d a l t i d h s l r e s k d v l i a d d r l s v	1900 2000
TCGACGCCGCCCTCCATGGCGTTCGCGGACGTTATCCTCGCGACGACGGCCGAGGCTGATCCGCCAAGGACGCCGCTGTGAGGGCGTTCAAGGTCTTTACT r a v h g v r g r i l a t t a e l i g e d a v e g v w f k v f t CCATACGCATCTCCGGAAGAATTCTTAAACGATGCGTTGACCATTGATCATTCTCTGGGGTGAATCCAAGGACGTTCTCATTGCCGATGATCGTTGTCTG p y a s p é e f l n d a l t i d h s l r e s k d v l i a d d r l s v	1900 2000
TCGACGCCGCCCTCCATGGCGTTCGCGGACGTTATCCTCGCGACGACGGCCGAGGCTGATCCGCCAAGGACGCCGCTGTGAGGGCGTTCAAGGTCTTTACT r a v h g v r g r i l a t t a e l i g e d a v e g v w f k v f t CCATACGCATCTCCGGAAGAATTCTTAAACGATGCGTTGACCATTGATCATTCTCTGGGGTGAATCCAAGGACGTTCTCATTGCCGATGATCGTTGTCTG p y a s p é e f l n d a l t i d h s l r e s k d v l i a d d r l s v	1900 2000
TECHACGCCATCCCCGAAGACTTTCGCATCCACCGCCTGACCACCGCCGAAGCTCATCCCGCAAGCCGCCGTGAGGCGTGTGGGTTCAAGGTCTTTACT CCATACGCATCTCCCGGAAGACTTTAAACGATGCGTTGACCATTGATCATTCTTCTGCGTGAATCCAAGGACGTTCTCATTGCCGATGATCGTTTGTCTG P y a s p é e f l n d a l t i d h s l r e s k d v l i a d d r l s v TGCTGATTTTCTGCCATCGAGGGCTTTGGATTCAACCTTTACGCACTGGATCTGGCCCAAAACTCCGGAAGCTACGAGGACGTCCTCACCGAGGCTTTTCGA L i s a i e s f g f n l y a l d l r q n s e s y e d v l t e l f e	1900 2000 2100
TCGACGCCGCCCTCCATGGCGTTCGCGGACGTTATCCTCGCGACGACGGCCGAGGCTGATCCGCCAAGGACGCCGCTGTGAGGGCGTTCAAGGTCTTTACT r a v h g v r g r i l a t t a e l i g e d a v e g v w f k v f t CCATACGCATCTCCGGAAGAATTCTTAAACGATGCGTTGACCATTGATCATTCTCTGGGGTGAATCCAAGGACGTTCTCATTGCCGATGATCGTTGTCTG p y a s p é e f l n d a l t i d h s l r e s k d v l i a d d r l s v	1900 2000 2100
TEGACGCCGCCGTCCATGGCGTTCGGGGACGTTATCCTCGCGACGACGGCCGAGGCGCGAGGACGCGCGAGGACGGCGTGAGGGCGTTTAACT TO A V B V T G T i l a t t a e l i g e d a v e g V W f k V f t CCATACGCATCTCCCGGAGGATTCTTAAACGATGCGTTGACCATTGATCATTCTCTGGGTGAATCCAAGGACGTTCTCATTGCCGATGATCGTTTGTCTG P Y a s p è e f l n d a l t i d h s l r e s k d V l i a d d r l s V TGCTGATTTCTGCCATCGAGGAGCTTTGGATTCAACCTTTACGGACTGGATCTGCCGAAAACTCCGAAAGCTACGAGGACGTCCTCACCGAGGCTTTTCGA L i s a i e s f g f n l y a l d l r q n s e s y e d v l t e l f e	1900 2000 2100
TCCATCCCCCTCCATCCCCTTCCCCCCACCCACCCCCCCC	1900 2000 2100
TCGACGCCCCAAGCCCTCCGCGAACCTCCCCCCACCACGCCCGACGCCGCCGACGACGCCCCGAAGCTCCGCCAAGCCCCCTGAGGGCGTGTGGTTCAAGGTCTTTACT CCATACGCATCTCCCGAAGAATTCTTAAACGATGCGTTGACCATTGATCATTCTCTGCGTGAATCCAAGGACGTTCTCATTGCCGATGATCGTTTGTCTG P y = S p é e f l n d a l t i d h s l r e s k d v l i a d d r l s v TGCTGATTTCTGCCATCGAGAGCCTTTGGATTCAACCTTTAACGACTGGATCTGCGCCCAAAACTCCGAAAGCTACGAGGACGTCCTCACCGAGGCTTTCGA l i s a i e s f g f n l y a l d l r q n s e s y e d v l t e l f e ACCCGCCCAAGTCACCGCAAACTACCGCGAACCTGCTGCAGCAGGAAGGTTGAGGTAGCGAACGGAACTGCGCTGAACCCCCCTGATCCCGCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCAC	1900 2000 2100 2200
TCCATCCCCCTCCATCCCCTTCCCCCCACCCACCCCCCCC	1900 2000 2100 2200
TCGACGCCCCAAGGCCTTCGCGGACCTTCCCGCGACGACGCCGACGCCGAGGCGACGCCGCGAGGACGCCGC	1900 2000 2100 2200
TCGACGCCCCATCGCCGTTCGCGGACCTTATCCTCGCGACCACGGCCGAGGCTGATCCGCCAAGGCCGCCGTTGAGGGCGTGTGGTTCAAGGTCTTTACT CCATACGCATCTCCCGGAGGATTCTTAAACGATGCGTTGACCATTGATCATTCTTCTGCGTGAATCCAAGGACGTTCTCATTGCCGATGATCGTTTGTCTG P y a s p é e f l n d a l t i d h s l r e s k d v l i a d d r l s v TGCTGGATTTCTGCCATCGAGGGCTTTGGATTCAACCTTTACGCACTGGATCTGGCGCCAAAACTCCGGAAAGCTACGAGGACGTCCTCACCGAGGCTTTTCGA L i s a i e s f g f n l y a l d l r q n s e s y e d v l t e l f e ACCCGCCCCAAGTCACCGCCAAACTACCGGCGAGCTGTCTCTGAAGGAAG	1900 2000 2100 2200
TCCACCCCCCCTCCATCCCCCTTCCCCCCCCCCTTCTCCCCCC	1900 2000 2100 2200 2300
TCCACCCCCCCTCCATCCCCCTTCCCCCCCCCCTTCTCCCCCC	1900 2000 2100 2200 2300
TCGACGCCCCATCGCCGTTCGCGGACCTTATCCTCGCGACCACGGCCGAGGCTGATCCGCCAAGGCCGCCGTTGAGGGCGTGTGGTTCAAGGTCTTTACT CCATACGCATCTCCCGGAGGATTCTTAAACGATGCGTTGACCATTGATCATTCTTCTGCGTGAATCCAAGGACGTTCTCATTGCCGATGATCGTTTGTCTG P y a s p é e f l n d a l t i d h s l r e s k d v l i a d d r l s v TGCTGGATTTCTGCCATCGAGGGCTTTGGATTCAACCTTTACGCACTGGATCTGGCGCCAAAACTCCGGAAAGCTACGAGGACGTCCTCACCGAGGCTTTTCGA L i s a i e s f g f n l y a l d l r q n s e s y e d v l t e l f e ACCCGCCCCAAGTCACCGCCAAACTACCGGCGAGCTGTCTCTGAAGGAAG	1900 2000 2100 2200 2300
TEGACGECECTECATGEGETTEGEGGACGTTCCTEGGCACGACGGETGGGTCGGCAGGACGCCTGTTGAGGGCGTGTTCAAGGTCTTTACT TO A V B V T B T I B T T B C I B C B C B V W F K V F T CCATACGCATCTCCGGAAGATTCTTAAACGATGCCTTGACCATTGATCATTCTTCTGGGTGATCCAAGGACGTTCTCATTGCCGATGATCGTTTGTCTG P Y B S P C C F I D D B I T I D B I T C C B K D V I B D D T I S V TGGTGATTTTCTGCCATCGAGAGCTTTGGATTCAACCTTTTAACGCACTGGATCTGGGGCAAACTCCGGAAGGTACGAGGAACTTCCTCAACGAGGACGTTCTCAACCGAGGCTTTTCGA L I S B I C S F B F D I V B I D I T Q D S C S Y C D V I T C I F C ACCCGCCCAAGTCACCGCAAACTACCGGCGAGGTGTCTCGAAGGAAG	1900 2000 2100 2200 2300
TICGACGCCCCGTCCATGGCGTTCGCGGACGTTATCCTCGCGCGAGCGGCGGGGGGGG	1900 2000 2100 2200 2300
TICGACGCCCCGTCCATGGCGTTCGCGGACGTTACCCTCGCCCCACGACGCCGCGAGGACGCCGCTGTGAGGGCGTGTGGTTCAAGGTCTTTACT TO SON BON TO FILE TO THE CONTROL TO THE SON T	1900 2000 2100 2200 2300
TICGACGCCCCGTCCATGGCGTTCGCGGACGTTATCCTCGCGCGAGCGGCGGGGGGGG	1900 2000 2100 2200 2300
TICGACGCCCCACCCACGACATICCTCCCCCACCCCCCCCCC	1900 2000 2100 2200 2300
TICGACGCCCCTCCATGGCGTTCGCGGACCTATCCTCCGCGCACGCA	1900 2000 2100 2200 2300
TEGRACECCECCTCCATEGGCTTCGCGGACGTTATCCTCGCGACGACGGCCGACGCGGACGACGGCGGACGACGGCGTGTGGTTCAAGGTCTTTACT CCATACGCCATCTCCGGAGAATTCTTAAACGATGCGTTGACCATTGATCATTCTCTGGCGTGAATCCAAGGACGTTCTCATTGCCGATGATCGTTTGTCTG P y a s p è e f l n d a l t i d h s l r e s k d v l i a d d r l s v TGCTGGATTTCTGCCCATCGAGGGCTTTGGATTCAAGCTTTAAGGCACTGGATCTGGGCCAAAACTCCGAAAGCTTACGAGGACGTTCTCATTGCCGAGCTTTTGGA L i s a i e s f g f n l y a l d l r q n s e s y e d v l t e l f e ACCCGCCCCAAGTCAACCGAACGAACTACCGGGAGCTTGTGGAAGGAA	1900 2000 2100 2200 2300 2400
TICGACGCCCCACCCACGACATICCTCCCCCACCCCCCCCCC	1900 2000 2100 2200 2300 2400

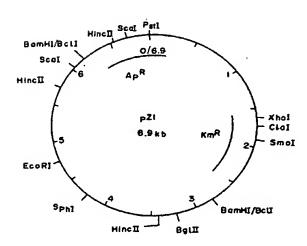
特別平2-291276 (14)

FIG. 3(4)

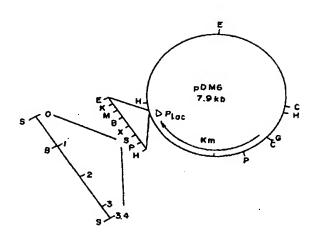
	1 10.5(4)
CTCCTGCAGCGCGACAACGTCCAGGAAGTCATGCTCGGTTACTCCGATTCCAACAAGGATGGCGGGATATTTCTCCGGCAAACTGGGCGCTTTACGACGCGG	
	222
llqrdnvqevmlgysdsntdgs,	2700
AACTGEAGCTEGTEGAACTATGCEGATCAGCEGGGGTCAAGCTTCGCCTGTTCCACGGCCGTGGTGGCACCGTCGGCCGGC	
ACTGCAGCTCGTCGAACTATGCCGATCAGCCGGGGTCAAGCTCGCCCTTTCGCTTTCGCCTTTCGCTTTTCGCTTTTCGCTTTCGCTTTCGCTTTCGCTTTCGCTTTCGCTTTCGCTTTCGCTTTCGCTTTCGCTTTTCGCTTTCGCTTTCGCTTTTCGCTTTTCGCTTTCGCTTTTCGCTTTTCGCTTTTCGCTTTTCGCTTTTCGCTTTTCGCTTTTCGCTTTTCGCTTTTCGCTTTTCGCTTTTCGCTTTTCGCTTTTTCGCTTTTTCGCTTTTTCGCTTTTTT	
lq l v e l c r s a g v k l r l f h g r g g t v g r g g g p s y d	7800
lq (ve crs a g v k (r () A y a g g g g g g g g g g g g g g g g g g	2000
COCCATTETTOCCCAGCCCAGGGGGGGGGGTGTCCAAGGTTCCGTGCGCATCACCGAGGCAGGGGGAGATCATCTCCCCTAAGTACGGCAACCCCGAAACCGCG	
CGCGATTCTTGCCCAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	
aila q prg a v q g s v r i t e q g e i i s a k y g n p e t a	2900
ailadprgavdgsvritedsc.	
COCCOMMENTERMOCECTOGTETCAGCCACGCTTCAGGCATCGCTTCTCGACGTCTCCGACGTCTCACCGATCACCAACGCGCGCTACGACATCATCATGAGTG	
rrnlealvs at teas to vale	3000
****,**********************************	
AGATETETGAGETEAGETTGAAGAAGTAEGEETCETTGGTGEAGGAGGATCAAGGETTEATEGATTAETTCAECCAGTECACGEEGCTGEAGGAGATTTGG	
is els Ikky as Lyhed qg, fidy ftqstplqeig	7100
1 s e l s l k k y a s l v m s o u a s s s s s s s s s s s s s s s s s s	3,00
•	
ATECETEAACATEGGATECAGGEETTEETCACGCAAGCAGACCTCCTCGGTGGAAGATTTGCGAGGEATCCCATGGGTGCTCAGGTGACAGTCTCGT	
sinigs rps srkqts svedir 8 i puvis wsqs r	
sinigarps srequality	3200
s in igs rps s, re q s a s	
GTEATECTBECAGGCTGGTTTGGTGTGGGAACCGCATTAGAGCAGTGGATTGGCGAAGGGGAGGGA	
valpgufgvgtatequigegequiqui	3300

•	
·	
•	
	E 1 C 2(E)
	F I G. 3(5)
TO THE REPORT OF THE PROPERTY	
ATGAGTCETGGCCATTTTTCACCTCAGTGTTGGATAACATGGCTCAGGTGATGTECAAGGCAGGCTGCGTTTGGCAAAGCTCTACGCAGACCTGATCCC	
ATGAGTCCTGGCCATTTTTCACCTCAGTGTTGGATAACATGGCTCAGGTGATGTCCAAGGCAGGC	
esupfits vidna a quas keet result y 2000	3400
e s u p f f t s v l d n m a q v m s t e e (, , , , , , , , , , , , , , , , ,	3400
AGATACGGAAGTAGTCGAGCGAGTCTATTCCGTCATCCGCGAGGAGTACTTCCTGACCAAGAAGATGTTCTGCGTAATCACCGGCTCTGATGATCTGCTT	3400
AGATACGGAAGTAGTCGAGCGAGTCTATTCCGTCATCCGCGAGGAGTACTTCCTGACCAAGAAGATGTTCTGCGTAATCACCGGCTCTGATGATCTGCTT	3400
ACATACOGAAGTACCCCACCGAGTCTATTCCGTCATCCGCGAGGAGTACTTCCTGACCAAGAAGATGTTCTGCGTAATCACCGGGCTCTGATGATCTGCTT d t e v a e r v y s v i r.e e y i l t k k m i e v i t m s d d l l	3700
ACATACOGAAGTAGECGAGGGAGTETATTCCGTCATCCGCGAGGAGGTACTTCETGAECAAGAAGATGTTETGGGTAATCACCGGGETCTGATGATCTGCTT d t e v a e r v y s v i r.e e y i l t k k m i e v i t m s d d l l	3500
ACATACOGAAGTACECCAGCGAGTCTATTCCGTCATCCGCGAGGAGTACTTCETGAECAAGAATGTTCTGCGTAATCACCGGGTCTGATGATCTGCTT d t e v a c r v y s v i r.e e y i l t k k m i e v i t m s d d l l GATGACAACCCACTTCTCGCCACGCTCTGTCCAGGGCCCGATACCCCCTACCCGCTTCCCACTCCACCGCTACCGCTACCGCTACCCCAAACG GATGACAACCCCACTTCTCGCCACGCTCTGTCCAGGGCCCGATACCCCCTACCGCTTCCCACTCCAACGTCGATCCAGGTAGAGATGATGCGATGCCTACCCAAAAG	3400 3500
ACATACOGAAGTACECCAGCGAGTCTATTCCGTCATCCGCGAGGAGTACTTCETGAECAAGAATGTTCTGCGTAATCACCGGGTCTGATGATCTGCTT d t e v a c r v y s v i r.e e y i l t k k m i e v i t m s d d l l GATGACAACCCACTTCTCGCCACGCTCTGTCCAGGGCCCGATACCCCCTACCCGCTTCCCACTCCACCGCTACCGCTACCGCTACCCCAAACG GATGACAACCCCACTTCTCGCCACGCTCTGTCCAGGGCCCGATACCCCCTACCGCTTCCCACTCCAACGTCGATCCAGGTAGAGATGATGCGATGCCTACCCAAAAG	3400 3500
ACATACOGAAGTACECCAGCGAGTCTATTCCGTCATCCGCGAGGAGTACTTCETGAECAAGAATGTTCTGCGTAATCACCGGGTCTGATGATCTGCTT d t e v a c r v y s v i r.e e y i l t k k m i e v i t m s d d l l GATGACAACCCACTTCTCGCCACGCTCTGTCCAGGGCCCGATACCCCCTACCCGCTTCCCACTCCACCGCTACCGCTACCGCTACCCCAAACG GATGACAACCCCACTTCTCGCCACGCTCTGTCCAGGGCCCGATACCCCCTACCGCTTCCCACTCCAACGTCGATCCAGGTAGAGATGATGCGATGCCTACCCAAAAG	3400 3500
AGATACGGAAGTAGECGAGGGAGTETATTCCGTCATCCGCGAGGAGGATACTTCETGAECAAGAAGATGTTETGGGTAATCACCGGGETCTGATGATETGGTT d t e v a e r v y s v i r.e e y f l t k k m f e v i t g s d d l l GATGACAACCCACTTCTCGCACGCTCTGTCCAGGGCCGATACCCCTACCTGCTTCCACTTCAACGTGATCCAGGTAGAGATGATGCGACGCTACCGAAAAG d d p l l a r s v q r r y p y l l p l n v i q v e m m r r y r k g	3400 3500 3600
ACATACOGAAGTACECCAGEGAGTETATTCCGTCATCCGCEAGGAGTACTTCETGAECAAGAAGATGTTETGGGTAATCACCGGGTCTGATGATCTGCTT d t e v a c r v y s v i r.e e y f l t k k m f e v i t g s d d l l GATGACAACCCACTTCTCGCACGCTCTGTCCAGGGCCGATACCCCTACCTGCTTCCACTTCAACGTGATCCAGGTAGAGATGATGCGAGGCTACCCAAAAG d d p l l a r s v q r r y p y l l p l n v i q v e m m r r y r k g	3400 3500 3600
CCCCCCAAGCCAGCCAGCCACCCACCCCCCCCCCCCCC	3400 3500 3600
CCCCCCAAGCCAGCCAGCCACCCACCCCCCCCCCCCCC	3400 3500 3600
ACATACOGAAGTACECCAGEGAGTETATTCCGTCATCCGCEAGGAGTACTTCETGAECAAGAAGATGTTETGGGTAATCACCGGGTCTGATGATCTGCTT d t e v a c r v y s v i r.e e y f l t k k m f e v i t g s d d l l GATGACAACCCACTTCTCGCACGCTCTGTCCAGGGCCGATACCCCTACCTGCTTCCACTTCAACGTGATCCAGGTAGAGATGATGCGAGGCTACCCAAAAG d d p l l a r s v q r r y p y l l p l n v i q v e m m r r y r k g	3400 3500 3600
ACATACCGAACTACCCAACCAGTCTATTCCGTCATCCGCCAAGAGATACTTCCTGACCAAGAAGATGTTCTGCGTAATCACCGGCTCTGATGATCTGCTT d t e v a e r v y s v i r e e y f l t k k m f e v i t g s d d l l GATGACAACCCACTTCTCGCACGCTCTGTCCAGCGCCGATACCCCCTACCTGCTTCCACTTCAACGTGATCCAGGTAGAGATGATGCGACGCTACCCAAAAG d d n p l l a r s v q r r y p y l l p l n v i q v e m m r r y r k g GCGACCAAGGCGAGGAAGTGTCCCGCAACATTCAGCTGACCCATGAACGGTCTTTCCACTGCGCTGCGCAAGTCCAGCCGGCTAGTCCAGCCGGCTAGTCCAGCCGGCTAGTCCAGCCGGCTAGTCCAGCCGGCTAGTCCAGCCGGCTAGTACAGTACGCTTTTCCACTGCGCTGCGCTAGTCCAGCCGGCTAGTCCAGCCGGCTAGTACAGTACGGTAGTACG d q s e q v s r n i q l t m n g l s t a l r n s g	3400 3500 3600
ACATACOGLAGIACECAGEGAGTETATICCGTEATECGEGAGGAGTAETTEETGAECAGGAAGATGTTETGEGTAATCACCGGGTCTGATGATETGETT d t e v a e r v y s v i r.e e y f l t k k m f e v i t g s d d l l GATGACAACCCACTTCTGGCACGGTCTGTCCAGGCCGGATACCCCCTACCTGCCTTCCACTGCATCCAGGTAGAGATGATGCGATGGCATGCTACCCAAAAG d d p p l l a r s v q r r y p y l l p l n v i q v e m m r r y r k g GCCCCCAAAGGCAAGTGTCCCGCAACATTCAGCTGACCATGAACGGTCTTTCCACTGCGCTGGGCTAGTCCAGCCGGGTAGTCCAGCCGGCTAGTAGCGATGAGAGAACGATGATGAGGCAACGGTTTTCCACTGCGCTAGGCAACGGCTAGTCCAGCCGGCTAGTAGCGATTGAACGGTTTTCCACTGCGCTAAGGCAACGAACATTTTCCACAATGGCAATGACGGTTTCCACTGCGCTAAGGCAAACGGATTTTCCACAATGGCAATTGACGGTTTCCACTGCGCTAAGGCAAACGGATTTTCCACAATGGCAATTGACGGTTTCCACTGCGCTTCCAAACGGCTAAGGCAACATTTTCCACAATGGCAATTGACGCTTTCCAAACGGTTAAGGCAATTGACGCTTTCCAAATGGCAATTGACGCTTTCCAAATGGCAATTGACGCATTGACGCTTTCCAAATGGCAATTTTCCAACATGGCAATTGACGCTTTCAAACGGTTAAACGGTTCCAACGGCTAAGGGCAAATTTTCCAACATGGCAATTGACGGTTTTCAACGGTTAAACGGTTCAACGGTTAAACGGTTCCAACGGCTAAGGCAAATTTTCCAACAATGGCCAATTGACGCTTTCAAACGGTTCAACGGTTTCCAACGGCAAAGGAACATTTTCCAACAATGGCCAATTGACGCTTTCAAACGGTTTCAACGGTTAAACGGTTCAACGGTTTCCAAACGGCTAAACGGTTCTCAAACGGTTAAACGGTTCAACGGCTAAACGGTTTTCCAACAGGCAAACATTTTCCAACAAGGCAATTTCAACGGCTTTCAAACGGTTTCAACAGGCAAACAATTTTCCAACAAGGCAATTTTCCAACAAGGCAATTTCAACGCTTTCAACAGGTTTCAACAATTTTCCAACAAGGCAATTTTCCAACAAGGCAATTTTCAACAACGATTTCAACAATTTTCCAACAAGGCAATTTCAACGCTTTCAAACGGTTTCAACAACAAAAAAAA	3400 3500 3600 3700
ACATACOGLAGIACECAGEGAGTETATICCGTEATECGEGAGGAGTAETTEETGAECAGGAAGATGTTETGEGTAATCACCGGGTCTGATGATETGETT d t e v a e r v y s v i r.e e y f l t k k m f e v i t g s d d l l GATGACAACCCACTTCTGGCACGGTCTGTCCAGGCCGGATACCCCCTACCTGCCTTCCACTGCATCCAGGTAGAGATGATGCGATGGCATGCTACCCAAAAG d d p p l l a r s v q r r y p y l l p l n v i q v e m m r r y r k g GCCCCCAAAGGCAAGTGTCCCGCAACATTCAGCTGACCATGAACGGTCTTTCCACTGCGCTGGGCTAGTCCAGCCGGGTAGTCCAGCCGGCTAGTAGCGATGAGAGAACGATGATGAGGCAACGGTTTTCCACTGCGCTAGGCAACGGCTAGTCCAGCCGGCTAGTAGCGATTGAACGGTTTTCCACTGCGCTAAGGCAACGAACATTTTCCACAATGGCAATGACGGTTTCCACTGCGCTAAGGCAAACGGATTTTCCACAATGGCAATTGACGGTTTCCACTGCGCTAAGGCAAACGGATTTTCCACAATGGCAATTGACGGTTTCCACTGCGCTTCCAAACGGCTAAGGCAACATTTTCCACAATGGCAATTGACGCTTTCCAAACGGTTAAGGCAATTGACGCTTTCCAAATGGCAATTGACGCTTTCCAAATGGCAATTGACGCATTGACGCTTTCCAAATGGCAATTTTCCAACATGGCAATTGACGCTTTCAAACGGTTAAACGGTTCCAACGGCTAAGGGCAAATTTTCCAACATGGCAATTGACGGTTTTCAACGGTTAAACGGTTCAACGGTTAAACGGTTCCAACGGCTAAGGCAAATTTTCCAACAATGGCCAATTGACGCTTTCAAACGGTTCAACGGTTTCCAACGGCAAAGGAACATTTTCCAACAATGGCCAATTGACGCTTTCAAACGGTTTCAACGGTTAAACGGTTCAACGGTTTCCAAACGGCTAAACGGTTCTCAAACGGTTAAACGGTTCAACGGCTAAACGGTTTTCCAACAGGCAAACATTTTCCAACAAGGCAATTTCAACGGCTTTCAAACGGTTTCAACAGGCAAACAATTTTCCAACAAGGCAATTTTCCAACAAGGCAATTTCAACGCTTTCAACAGGTTTCAACAATTTTCCAACAAGGCAATTTTCCAACAAGGCAATTTTCAACAACGATTTCAACAATTTTCCAACAAGGCAATTTCAACGCTTTCAAACGGTTTCAACAACAAAAAAAA	3400 3500 3600 3700
ACATACOGAAGTACECCAGCCAAGTCTATTCCGTCATCCGCCGAGGAGTACTTCCTGACCAAGGAAGATGTTCTGCGTAATCACCGGCTCTGATGATCTGCTT d t e v a e r v y s v i r e e y f i t k k m f e v i t g s d d i i GATGACAACCCACTTCTGGCACGGCTGTGTCAGGCCCGATACCCCCTACCTGCGTTCCACCTGATCCAGGTAGAGAATGATGCGATGCTACCGAAAAG d d n p i i a r s v q r r y p y i i p i n v i q v e m m r r y r k g GCCCCCAAGGCAAGTGTCCCGGCAACTTCAGCTGACCATGAACGGTCTTTCCACTGCGCTGCGCAACTCCGGGTAGTCCAGGCGGGTAGTAC d q s e q v s r n i q i t m n g i s t a i r n s g TCGTGTATACTGTCTAAAGTTATTCGAATCAGGTGGGCATAAGGTTCACCTGGGTTCTCAACGGCAAAGGAACATTTTCCACAGGCAATGACGCTTC	3400 3500 3600 3700
AGATACGGAAGTAGECGAGGGAGTETATTECGTEATECGGEAGAGGAGTAETTEETGAECAAGGAAGATGTTETGGGTAATCACCGGGETCTGATGATCTGGTT d t e v * e r v y * v r · e e y f t k k m f e v t g * d d t GATGACAACCCACTTCTCGCACCGGETCTGTCCAGGGCGCGATACCCCCTACCTGCGTTCCACTCAACGGTAGAGGATGATGCGACGGTACCGCAAAAG d d n p t * r * v q r r y p y t l p t n v i q v e m m r r y r k g GCGACCAAAGGGAAGGAAGGTGTCCCGGAACATTCAGGTGACCGATGTTTCCACTGCGGTGGGTAACTCCGGGTAGTCCAGGCGGGTAGTAC d q * e q v * r n i q t * m n g t * t * t r n * g TCGTGTATACTGTCTAAAGTTATTCGAAATCAGGTGGGCATAAGGTTCACCTGGGGTTCTCAAAGGGCAAAGGAACATTTTCCACAGGCAATGACGGTTGACGGTTGAAGGGCAAAGGGAACATTTTCCACCTGCGTTGGGTAGTGACGGTTGAAGGGCAAAGGGAACATTTTCCACCTGCGTTGGGTAGTGACGGTTGAAGGGCAAAGGGAACATTTTCCACCTGCGTTGGGTAGTGACGGTTGAAGGGCAAAGGGCGAAAGGAACATTTTCCACCTGCGTTGGGTAGTGACGGTTGAAGGGCAAAGGGCGAAAGGAACATTTTCCACCTTCTGGTGGCGGTGGGTAGTGACGGTTGAAGGGCAAAGGGCGAAAGGCACCTCTCCACCCCTCTTCGGTGGCGGTGGGGTAGTGACGGTTGAAGGGCAAAGGGCGAAAGGGCGACCTCTCCACCCCTCTTCGGTGGCGGTGGGGTAGTGACGGTTGGACGGTGGGGAAAGGGCGAAAGGCACCTCTCCCACCCCTCTTCGGTGGCGGTGGGGAAGGCAAAGGGCGGGGGGACTCTCCCACCCCTCTTCGGTGGCGGGGGGGG	3400 3500 3600 3700
AGATACGGAAGTAGECGAGGGAGTETATTECGTEATECGGEAGAGGAGTAETTEETGAECAAGGAAGATGTTETGGGTAATCACCGGGETCTGATGATCTGGTT d t e v * e r v y * v r · e e y f t k k m f e v t g * d d t GATGACAACCCACTTCTCGCACCGGETCTGTCCAGGGCGCGATACCCCCTACCTGCGTTCCACTCAACGGTAGAGGATGATGCGACGGTACCGCAAAAG d d n p t * r * v q r r y p y t l p t n v i q v e m m r r y r k g GCGACCAAAGGGAAGGAAGGTGTCCCGGAACATTCAGGTGACCGATGTTTCCACTGCGGTGGGTAACTCCGGGTAGTCCAGGCGGGTAGTAC d q * e q v * r n i q t * m n g t * t * t r n * g TCGTGTATACTGTCTAAAGTTATTCGAAATCAGGTGGGCATAAGGTTCACCTGGGGTTCTCAAAGGGCAAAGGAACATTTTCCACAGGCAATGACGGTTGACGGTTGAAGGGCAAAGGGAACATTTTCCACCTGCGTTGGGTAGTGACGGTTGAAGGGCAAAGGGAACATTTTCCACCTGCGTTGGGTAGTGACGGTTGAAGGGCAAAGGGAACATTTTCCACCTGCGTTGGGTAGTGACGGTTGAAGGGCAAAGGGCGAAAGGAACATTTTCCACCTGCGTTGGGTAGTGACGGTTGAAGGGCAAAGGGCGAAAGGAACATTTTCCACCTTCTGGTGGCGGTGGGTAGTGACGGTTGAAGGGCAAAGGGCGAAAGGCACCTCTCCACCCCTCTTCGGTGGCGGTGGGGTAGTGACGGTTGAAGGGCAAAGGGCGAAAGGGCGACCTCTCCACCCCTCTTCGGTGGCGGTGGGGTAGTGACGGTTGGACGGTGGGGAAAGGGCGAAAGGCACCTCTCCCACCCCTCTTCGGTGGCGGTGGGGAAGGCAAAGGGCGGGGGGACTCTCCCACCCCTCTTCGGTGGCGGGGGGGG	3400 3500 3600 3700
ACATACOGAAGTACECCAGCCAAGTCTATTCCGTCATCCGCCGAGGAGTACTTCCTGACCAAGGAAGATGTTCTGCGTAATCACCGGCTCTGATGATCTGCTT d t e v a e r v y s v i r e e y f i t k k m f e v i t g s d d i i GATGACAACCCACTTCTGGCACGGCTGTGTCAGGCCCGATACCCCCTACCTGCGTTCCACCTGATCCAGGTAGAGAATGATGCGATGCTACCGAAAAG d d n p i i a r s v q r r y p y i i p i n v i q v e m m r r y r k g GCCCCCAAGGCAAGTGTCCCGGCAACTTCAGCTGACCATGAACGGTCTTTCCACTGCGCTGCGCAACTCCGGGTAGTCCAGGCGGGTAGTAC d q s e q v s r n i q i t m n g i s t a i r n s g TCGTGTATACTGTCTAAAGTTATTCGAATCAGGTGGGCATAAGGTTCACCTGGGTTCTCAACGGCAAAGGAACATTTTCCACAGGCAATGACGCTTC	3400 3500 3600 3700
ACATACCGAAGTAGCCCAGCGAGTCTATTCCGGTCATCCGCCGAGGGAGTACTTCCTCCACCAAGAACATGTTCTGCGTAATCACCGGCTCTGATGATCTGCTT d t e v a e r v y s v { r e e y f t k k m f e v t g s d d CATGACAACCCACTTCTCGGCACGCTCTGTCCAGGGGCGGATACCCCCTACCTGCTTCCACTCAACGTGATCCAGGTAGAGGATGATGCGAACGCTAACCCAAAAG d d n p a r s v q r r y p y p n v q v e m m r r y r k g CCGACCAAAGGGAACCAAGTGTCCCGCAACATTCAGGTGACCAATGAACGGTCTTTCCACTGCGCTGCGGAACCTCCGGGCTAGTCCAGGCGGGTAGTAG d q s e q v s r n q t m n g s t a r n s g TCGGTGTATACTGTCTAAGTTATTCGAATCAGGTGGGGAATAAGGTTCACCTGGGTTCTCAAACGGCAAAGGAACATTTTCCACAGGCAATGACGCTTC AAATCATCCTTCGTCGGCCGCCCGCCTCCTCATGACGGTTTTCGTCTTGCTGCACAAGGGCAAAGGCGGCGGACTCTCCAGGCCTGTTCGGTGGCGGTGGGCAAGGAACACTCTCCAGCCTCTTCGGTGGCGGTGGCGAAGGAACACTCTCCAGCCTCTTCGGTGGCGGTGGCGAAGGAACACTCTCCAGCCTCTTCGGTGGCGGTGGCGAACAAGGCGGGGGGGACCTCTCCAGCCCTCTTCGGTGGCGGTGGGTG	3400 3500 3600 3700 3800
AGATACGGAAGTAGCCGAGCGAGTCTATTCCGTCATCCGCGAGGAGTACTTCCTGACCAAGAGGAGTGTTCTGCGTAATCACCGGGCTCTGATGATCTGCTT d t e v a c r v y s v i r e e y f l t k k m f c v i t g s d d l l GATGACAACCCACTTCTCGCCACGCTCTGTCCAGGGGCGATACCCCCTACCTGCTTCCACTCAACGGTAGTCCAGGTAGAGATGATGCGATGGCTACCGAAAAG d n p l l a r s v q r r y p y l l p l n v i q v e m m r r y r k g GCGACCAAAGCGGAGCAAGTGTCCCGGCAACATTCAGGTGACCAATGAACGGTCTTTCCACTGCGGTGGGAACTCCGGGCTAGTCCAGGCGGGTAGTAC d q s e q v s r n i q l t m n g l s t a l r n s g TCGTGTATACTGTCTAAGTTATTCGAAATCAGGTGGGCATAAGGTTCACCTGGGTTCTCAAACGGCAAAGGAACATTTTCCACATGGCATTGACGGTTC AAATCATCCTCGTCGTCGGCCAGCCTGCTCATGACGGTTTTCGTCTTGCTGCACAACGGCAAAGGGAACATTTTCCACATGGCATTGACGCTTCAACGGTAGACCGTTTTCGTCTGCATTGGCGTTATCTGCATTGTCATTGTCGATTGTCATTGTCATTG	3400 3500 3600 3700 3800
ACATACCGAAGTAGCCCAGCGAGTCTATTCCGGTCATCCGCCGAGGGAGTACTTCCTCCACCAAGAACATGTTCTGCGTAATCACCGGCTCTGATGATCTGCTT d t e v a e r v y s v { r e e y f t k k m f e v t g s d d CATGACAACCCACTTCTCGGCACGCTCTGTCCAGGGGCGGATACCCCCTACCTGCTTCCACTCAACGTGATCCAGGTAGAGGATGATGCGAACGCTAACCCAAAAG d d n p a r s v q r r y p y p n v q v e m m r r y r k g CCGACCAAAGGGAACCAAGTGTCCCGCAACATTCAGGTGACCAATGAACGGTCTTTCCACTGCGCTGCGGAACCTCCGGGCTAGTCCAGGCGGGTAGTAG d q s e q v s r n q t m n g s t a r n s g TCGGTGTATACTGTCTAAGTTATTCGAATCAGGTGGGGAATAAGGTTCACCTGGGTTCTCAAACGGCAAAGGAACATTTTCCACAGGCAATGACGCTTC AAATCATCCTTCGTCGGCCGCCCGCCTCCTCATGACGGTTTTCGTCTTGCTGCACAAGGGCAAAGGCGGCGGACTCTCCAGGCCTGTTCGGTGGCGGTGGGCAAGGAACACTCTCCAGCCTCTTCGGTGGCGGTGGCGAAGGAACACTCTCCAGCCTCTTCGGTGGCGGTGGCGAAGGAACACTCTCCAGCCTCTTCGGTGGCGGTGGCGAACAAGGCGGGGGGGACCTCTCCAGCCCTCTTCGGTGGCGGTGGGTG	3400 3500 3600 3700 3800
AGATACGGAGTAGECGAGCGAGTETATTCCGTCATCCGCCAGGGAGTACTTCETGACCAGGAAGATGTTETGCGTAATCACCGGGETCTGATGATCTGCTT d t e v a e r v y s v i r e e y i l t k k m i e v i t m s d d l l GATGACAACCCACTTCTCGGACGGCTCTGTCCAGGGCCGATACCCCCTACCTGCCTTCCACTTCACCTGGATGCAGGGAAGAAGAATGATGGGAGGCTAGCGGAAAAG d d n p l l a r s v q r r y p y l l p l n v i q v e m m r r y r k g GCCGACCAAAGCGAGGCAAGTGTCCCGCAACATTCAGGTGACCAGGTCTTTCCACTGCGCTGGGCTAGTCCAGGCGGGTAGTCCAGGCGGGTAGTAC d q s e q v s r n i q l t m n g l s t a l r n s g TCGTGTATACTGTCTAAAGTTATTCGAAATCAGGTGGGCCATAAGGTTCACCTGGGTTCTCAACGGCAAAGGGAAGAATATTTCCACAATGGCATTGACGGTTGC AAATCATCCTTCGGGCTCCACCCTGCTCATGACGGTTTTCGTTCTGCTGGCAAAGGGGGAAAGGCGGGGGGAACTCTCCAGCCTCTTCGGTGGCGGTGGTAGAGGGGGAAGGGCGGGGGGGAACTCTCCAGCCGTTTCGGTGGCGGTGGGATGGGGGGGG	3400 3500 3600 3700 3800 3900
AGATACGGAGTAGECGAGGTCTATTCCGTCATCEGCGAGGAGTACTTCCTGAECAGAAGATGTTETGCGTAATCAGCGGGTCTGATGATCTGCTT d t e v a e r v y s v i r.e e y f l t k k m f e v i t g s d d l i GATGACAACCCACTTCTGGCAGGCTGTTCCAGGGCCGGATACCGCTACCTGGTTCCACTGACGTGATCCAGGTAGAGATGATGCGAGGTAGTGCGAGGTAGTAGGGTAGTAGGGTAGTAGGGTAGTAGGGTAGTA	3400 3500 3600 3700 3800 4 3900
AGATACGGAGTAGECGAGGTCTATTCCGTCATCEGCGAGGAGTACTTCCTGAECAGAAGATGTTETGCGTAATCAGCGGGTCTGATGATCTGCTT d t e v a e r v y s v i r.e e y f l t k k m f e v i t g s d d l i GATGACAACCCACTTCTGGCAGGCTGTTCCAGGGCCGGATACCGCTACCTGGTTCCACTGACGTGATCCAGGTAGAGATGATGCGAGGTAGTGCGAGGTAGTAGGGTAGTAGGGTAGTAGGGTAGTAGGGTAGTA	3400 3500 3600 3700 3800 4 3900
AGATACGGAAGTAGCCCAGCCAGCCTATTCCGTCATCCGCCAGGGAGTACTTCCTGACCAAGAAGATGTTCTGCGTAATCACCGGCTCTGATGATCTCGCTT d t e v a e r v y s v i r.e e y f l t k k m f e v i t g s d d l ! GATGACAACCCACTTCTCGCCAGGGCTGTTGCCAGGGCGGATACCCCCTACCTGCTTCCACTCAACGTGATCCAGGTAGAGATGATGGGACGCTACCGAAAAG d d n p l l a r s v q r r y p y l l p l n v i q v e m m r r y r k g GCGACCAAAGCGAGGAGGTGTCCCGCAACATTCAGGTGACCAATGAACGGTCTTTCCACTGCGCTGGGGTAACCTGGGTAGGGAACCTGGGGTAGGTA	3400 3500 3600 3700 3800 3900 4000
ACATACCGAAGTACCCACCGAGGTCTATTCCGTCATCCGCCGAGGGGGGGG	3400 3500 3600 3700 3800 4000
AGATACGGAGTAGECGAGGTCTATTCCGTCATCEGCGAGGAGTACTTCCTGAECAGAAGATGTTETGCGTAATCAGCGGGTCTGATGATCTGCTT d t e v a e r v y s v i r.e e y f l t k k m f e v i t g s d d l i GATGACAACCCACTTCTGGCAGGCTGTTCCAGGGCCGGATACCGCTACCTGGTTCCACTGACGTGATCCAGGTAGAGATGATGCGAGGTAGTGCGAGGTAGTAGGGTAGTAGGGTAGTAGGGTAGTAGGGTAGTA	3400 3500 3600 3700 3800 4000

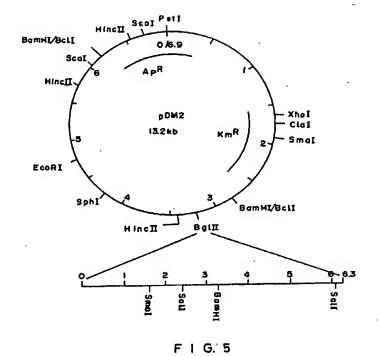
ACATETTTAMAGGGGMCTGTTTCCCGACGGACGTGGGGTCTATAMACCGCAGGTTAMACGCTGCCATAGGGGATTTTTCGGCTGGGAGACCTGGT	
,,,	430D
GTANGT GCGGGTTAMACGTGAECTTCGTTATAMACAGAMTCTATAGACGAYAGGTAMACTGGAETAGGTTTATCTATAGCGGAATAGAMAT	
,,,,,,	4400
ACTCCGCTCGACAGCATCACTTAGCTGAAAGGCCTTTAACATGGACCCCTCAGATCTAGCCTGGATTETCGCAGCTTTTGCGTTGGTAAGCCTGATGTTC	
,+,+,+,+,+,+,+,+,	4500
CCCGGATTGTCCCTGCCTCTACGGCGGCATGCCTGGGTGGG	•
,,,,	4400
ACATCATTTATGGACACGGACTTGTCTTAGGAAAGTECATCGGTGGGTGGGGAATTATCGGAAATCCCCTTGAATACTTCGGCTTCCGCAACATTATGGA	
****,-******,-*****,-*,-*,-*,-*,-*,-*,-*	4700
AGATGAEGGGAEGGGAGACCTCATGTGGGGCCGGCTTCTACATTCTGTTCGCTGCAATCTCACTCGCACTTGTTTCATCTGGTGCAGCGGGGGGCATGCCC	
,,,,	4800
TTTGGAGCGTGGCTGGTCTTCGGGTGTCCTGTGGTTCACCTTTGTGTACGCGCCACTGGCACACTGGGTTTTCGGTATCGATGATC	

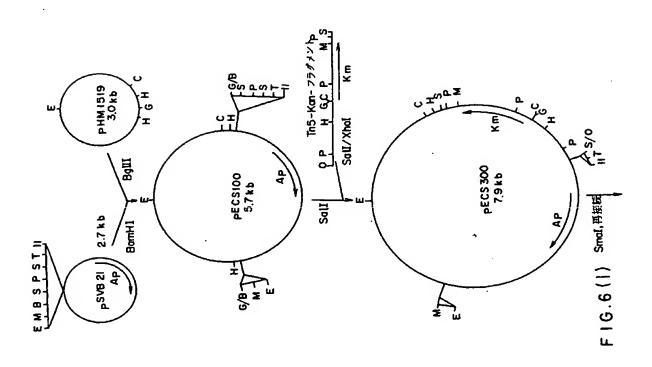


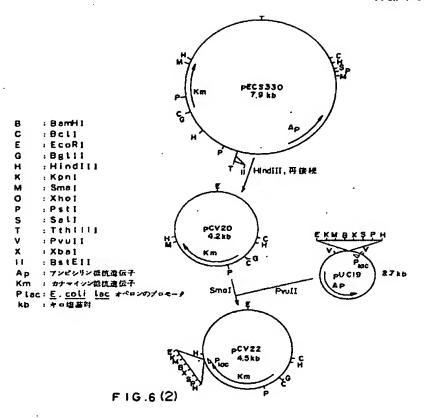
F. 1 G. 4



F 1 G. 7







第1頁の統	ŧ		•
@Int. CI	. 5	識別記号	庁内整理番号
C 12 P	13/08	A	8931-4B
	13/10	ACBACAAB	8931-4B 8931-4B
	13/12 13/14	A A	8931-4B 8931-4B 8931-4B
12 N N N N N N N N N N N N N N N N N N N	13/24 9/88 15/60 1: 15) 1/21 1: 13) 13/06 1: 13 1: 15) 13/10 1: 13 1: 15) 13/12 1: 13 1: 15) 13/14 1: 13 1: 15) 13/14 1: 13 1: 15)	B A	8931-4B 8931-4B 7823-4B
	1: 15)		-689-

特别平2-291276 (18)

ンストシユトラーセ
ドレーゲシユトラー
ム・ヴアルトシ ユ
・シヤフハウゼ 3
デ・ミユゲ 26
・ラ・デイヴィジョ
フ・リユ・デ・アリ